

CAUSAS DE LA APARICIÓN DE LA ENFERMEDAD MANCHA VERDE EN HOJAS DE TABACO (*NICOTIANA TABACUM* L.)

Danneys Armario Aragón,¹ Sinesio Torres García,² Oguelis Rodríguez Pérez,³ Iban Arredondo Quevedo,¹ Yunetsy Girado López¹ y Ángel Mollineda Trujillo²

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, CP 53 000, danneys@inivit.co.cu

² Facultad de Ciencias Agropecuarias (UCLV). Carretera a Camajuaní, Km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, sinesiotg@agronet.uclv.edu.cu

³ División Centro Oeste de Tabaco. Villa Clara, Cuba, dcoetr@enet.cu

RESUMEN

La enfermedad de la mancha verde del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), de origen desconocido, es responsable de considerables pérdidas en las hojas para el tabaco torcido y para las capas que se comercializan; por lo tanto, el objetivo de este trabajo es mostrar que la aparición de la enfermedad de la mancha verde está relacionada con los fungicidas compuestos por manganeso (Mn) y zinc (Zn), como en el caso del mancozeb y con las características morfológicas de cada variedad. El mayor número de hojas manchadas apareció en los niveles medio e inferior de las plantas tratadas y no se observaron manchas en las no tratadas. Las hojas hervidas de plantas sin aplicación tomaron un color oscuro típico de la feofitina, mientras que las hojas tratadas presentaron tonalidades verdes. Las manchas aparecieron en las partes de las hojas donde la concentración de Mn era la misma o mayor que el magnesio (Mg). La enfermedad fue evidente solo en las plantas tratadas, lo que demuestra que la causa de la mancha verde del tabaco está dada por la acumulación de Mn en las regiones del limbo; o sea, tiene lugar un exceso de Mn por encima de las concentraciones mínimas permisibles y una sustitución del Mg por el Mn en las moléculas de la clorofila. La variedad Habana 2000 resultó ser la más susceptible y la de más bajo índice de esclerofilia, mientras Criollo 98 fue la más tolerante y de mayor índice de esclerofilia, características que se relacionan directamente con la incidencia de la mancha. El estrato foliar superior fue el menos afectado.

Palabras clave: mancha verde, tabaco, manganeso, Mancozeb, clorofila

ABSTRACT

Tobacco green spot disease, of unknown origin, is responsible of considerable losses in leaves for twisted tobacco and layers for marketing, in that way it was realized a research work to show that appearance of green spot disease is related with fungicides composed by Mn and Zn, like mancozeb, and to morphologic characteristics of tobacco varieties too. The highest number of spotted leaves appeared in middle and low levels of treated plants, and there were no spot in non-treated plants. Non-treated boiled leaves got the typical brown color of feofitine, while treated leave presented green tonalities. Spots appear in leaf parts where Mn concentration was the same or bigger than Mg concentration. The disease was evident only in treated plants, showing that the cause of tobacco green spot is due to Mn accumulation in leaf limb regions, that is an excess of Mn above minimum concentrations takes place, as well as, a replacement by Mg in the chlorophyll molecules. 'Havana 2000' variety was the most susceptible and showed the lowest sclerophyllous rate, while, Criollo-98 variety was more tolerant and presented the highest sclerophyllous rate which are characteristics closely related with the spot incidence. The superior leaf stratum was the least affected one.

Key words: green spot, tobacco, manganese, Mancozeb, chlorophyll

INTRODUCCIÓN

Entre los mecanismos que explican la declinación de la fotosíntesis en las plantas están el daño peroxidativo de las funciones de la membrana del tilacoide—que repercute sobre la actividad fotoquímica de los fotosistemas I y II de los cloroplastos—, el decrecimiento de la actividad de las enzimas fotosintéticas por los productos de la polifenoloxidación y la disminución en la actividad de carboxilación de la ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) [Kitao *et al.*, 1997a; 1998], observados en hojas de plantas de trigo y tabaco, con la aplicación de alta concentración de Mn.

Según Jordan y Ogren (1981), la sustitución del Mg por el Mn puede ocurrir, dado el cambio de las propiedades de la enzima rubisco, donde es posible con adicción de Mn ocasionar el remplazo del Mg de tal enzima por Mn y formar la rubisco Mn, con lo cual tiene una mayor proporción de actividad oxigenasa que carboxilasa. Por su parte, Pequeño (1964) reportó que en condiciones artificiales, al añadir acetato de cobre (Cu) y zinc (Zn) a hojas fotosintéticamente activas y mediante calentamiento, se origina una modificación en la estructura de la clorofila, los protones de hidrógeno pueden sustituir temporal-

mente al Mg de la clorofila (formación de fofitina), solo que el sitio que le correspondía al Mg es ocupado por el Cu o el Zn y toma un color verde azulado. Además, se ha observado que la tasa fotosintética de hojas jóvenes de tabaco Burley disminuyó hasta 60% en comparación con el control, con altos tratamientos de Mn cuando este aumentó a 5 mg.g⁻¹ de peso seco (PS) [Nable *et al.*, 1988].

El objetivo de este trabajo fue demostrar que la aparición de la mancha verde se relaciona con los fungicidas compuestos por Mn y Zn, componentes del fungicida mancozeb 80% PH, y que las características morfológicas inherentes a cada variedad inciden en su susceptibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Central de Villa Clara, con plantas procedentes de las CCS El Vaquerito, en Santa Clara, de enero a junio del 2002. Se realizaron dos experimentos sobre suelo pardo con carbonatos con diseños de bloques al azar y cuatro réplicas, uno para evaluar el efecto del fungicida a base de Mn y Zn, y otro para valorar la sensibilidad varietal.

1. Estudio del efecto de la aplicación del fungicida mancozeb 80% PH en la aparición de la mancha verde

Se evaluó un tratamiento con aplicación de fungicida mancozeb 80% PH a la dosis de 3 kg.ha⁻¹ [MINAGRI, 1999] y otro sin aplicación de fungicida (testigo absoluto) sobre la variedad de tabaco Habana 2000. Se determinó el número de hojas con manchas verdes (NHM) por estrato foliar, clasificadas con respecto al grado de afectación según una escala de patrón de colores elaborada al efecto, con la siguiente gradología:

- 0: No presencia de mancha.
- 1: Manchado ligero.
- 2: Manchado medio.
- 3: Manchado fuerte.

De las hojas se extrajeron las áreas manchadas con los diferentes grados y se determinó la concentración de microelementos (Mg, Mn, Zn y Cu), para lo cual se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica marca SP-9 Pye Unicam.

Hojas verdes de ambos tratamientos se cocieron en agua destilada a temperaturas entre 80 y 100°C para favorecer la ruptura de las membranas y facilitar la penetra-

ción del protón H⁺, proveniente de la ionización de los ácidos orgánicos de la vacuola, al cloroplasto. Se determinó el pH del jugo vacuolar en la disolución por medio de un conductímetro-pH metro INOLAB, Level 1, de fabricación alemana.

2. Estudio del comportamiento varietal con aplicación del fungicida mancozeb 80% PH a 3 kg.ha⁻¹

Se utilizaron las variedades Habana 2000, Criollo 98 y Corojo 99. Las plantas por evaluar se subdividieron en tres niveles foliares de acuerdo con la selección de producción: inferior (libre pie y uno medio), medio (primer y segundo centro ligeros) y superior (primer y segundo centro fino), y en ellos se determinó el número de hojas con manchas verdes por nivel. En total se evaluaron 36 hojas por planta y 12 hojas por nivel.

El área foliar (AL) se determinó por la fórmula:

$$AL = \sum (l \times a) \times f$$

donde:

l: Longitud de la hoja

a: Ancho de la hoja

f: Coeficiente de área foliar para el tabaco (*f* = 0,70)

El índice de esclerofilia (*IE*) o masa seca (*MS*) por unidad de área del limbo (*AL*) se determinó por variedad y estratos a través del método del coeficiente de área foliar, y se calculó mediante la ecuación:

$$IE = PS/AL$$

donde:

PS: Peso seco del limbo (g)

AL: Unidad de área del limbo (dm²)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio del efecto de la aplicación del fungicida mancozeb 80% PH en la aparición de la mancha verde

Con aplicaciones del fungicida cada siete días se presentaron las mayores incidencias sobre los estratos medios e inferior (*Tabla 1*). Donde no se aplicó el producto no hubo aparición de la enfermedad en ninguno de los estratos. De acuerdo con Kitao *et al.* (1997b), la causa de la mancha verde está asociada a la capacidad de los iones de Mn y/o Zn para sustituir el Mg de la molécula de clorofila a nivel celular. Así forma una clorofila que no puede ser degradada por la acción de la clorofilasa y no ser convertida en feofitina por la actividad de los protones H⁺ del jugo celular (al menos al

pH presente en el tejido celular del tabaco). Kitao *et al.* (1997b) plantean el efecto peroxidativo sobre las membranas de los cloroplastos y todo el sistema membranoso, con lo cual hace a las células más permeables incluso a este mismo ión.

Tabla 1. Efecto de la aplicación del fungicida mancozeb 80% PH sobre la aparición de la mancha verde en los distintos estratos foliares (12 hojas evaluadas por estrato)

Nivel	Hojas afectadas por nivel de la planta			
	Con aplicación		Sin aplicación	
	Número	Por ciento	Número	Por ciento
Inferior	6,50 b	54,16	0	0
Medio	6,00 b	50,00	0	0
Superior	3,50 a	29,16	0	0
ES	± 0,40			

Medias con letras diferentes difieren para Duncan ($p < 0,05$).

Que la mancha verde aparezca indistintamente en cualquier zona de las hojas significa que el efecto de la sustitución del Mg por el Mn fue solo donde la concentración alcanzó un valor superior a 5,9 mg de Mn.g⁻¹ de

MS de hoja (Tabla 2), y se hacen más intensas (grados 2 y 3) cuando son mayores las concentraciones de Mn y Zn. Se observó que el daño aparece cuando la concentración de Mn se iguala o sobrepasa a la de Mg.

Tabla 2. Concentración de micronutrientes en zonas de tejido foliar con mancha verde y sin ella

Grado de afectación	Concentración del microelemento (mg.g ⁻¹)			
	Mg	Mn	Zn	Cu
Testigo absoluto	6,20 cb	0,066 a	0,135 a	0,173 c
No manchada (0)	6,23 cb	0,081 a	0,110 a	0,043 b
Manchado ligero (1)	6,40 c	5,900 b	0,346 b	0,038 a
Manchado medio (2)	5,60 ab	7,650 c	0,369 b	0,036 a
Manchado fuerte (3)	5,40 a	9,310 d	0,396 b	0,045 b
ES (±)	0,22	0,08	0,01	0,001

Medias con letras diferentes difieren para Duncan ($p < 0,05$).

Las hojas tratadas con Mancozeb mantuvieron su color verde inicial total o parcialmente una vez que fueron hervidas. Esto prueba que la clorofila con Mn no puede ser convertida en feofitina por acción de los protones H⁺, como sucede con la clorofila magnésica, a pesar que en el análisis del jugo celular de las hojas de tabaco el pH estuvo entre 5,04 y 5,08 (ácido), lo cual favorece la transformación de la clorofila hacia feofitina por calentamiento, estrés hídrico o peroxidación de las membranas. Estas se hacen permeables a los iones H⁺, los que pueden migrar de la vacuola al interior del cloroplasto [Vázquez y Torres, 1995]. Tal es la causa

por lo que la mancha verde perdura en las hojas secas, aun después del curado. Es común que los botánicos apliquen el principio de la sustitución del Mg de la clorofila en condiciones artificiales, con la utilización de soluciones concentradas de acetato de Zn o Cu en caliente [Pequeño, 1964], pero no se ha reportado que estos iones estén asociados a la sustitución de micronutrientes en condiciones naturales, y mucho menos que lo haya hecho el Mn; sin embargo, debido a su mayor variación en el número de valencias (2+, 3+ y 4+) en dependencia del pH del medio y la alta concentración en el tejido de la hoja (más de 5 mg.g⁻¹ MS), el Mn

perfectamente puede sustituir al Mg en la clorofila en condiciones naturales.

2. Estudio del comportamiento varietal con aplicación del fungicida mancozeb 80% PH

El comportamiento de las variedades con la aplicación de una dosis de 3 k.ha⁻¹ fue diferente. La menor afectación se observó en la variedad Criollo 98, seguida de Corojo 99, ambas procedentes del cruzamiento entre las variedades Habana PR y Habana 92, cuyo origen es el cruce entre Corojo con RxT de Polonia [Espino *et al.*, 2000]; sin embargo, la Habana 2000 fue la más afectada (Tabla 3). Esta variedad procede del cruzamiento entre Corojo y Habana 2.1.1, y esta última el resultado del cruce de Corojo con la variedad norteamericana Bell 61-9 [MINAGRI, 2001]. Es posible que entre las características morfológicas heredadas por la Habana 2000 se encuentren la presencia de hojas de láminas foliares más onduladas y finas, con formación de fosos, y conjuntamente paredes celulares y cutículas más delgadas respecto al resto, factores que facilitan la permeabilidad a agentes externos (iones) acumulados en el limbo, junto con los pesticidas en altas concentraciones, durante un prolongado tiempo, y que a su vez esto no suceda de igual forma en otras variedades.

Tabla 3 Comportamiento de las hojas encontradas con manchas por cada variedad de un total de 36 evaluadas

Variedades	Número de hojas afectadas
Criollo 98	7,25 a
Corojo 99	9,75 b
Habana 2000	16,00 c
ES±	0,45

Las afectaciones en cada variedad se distribuyeron de diferente forma. Criollo 98 mostró mayor número de hojas manchadas en el estrato inferior y menos en el superior, el cual resultó estadísticamente similar a la porción media de la planta. Por su parte, en Corojo 99 el daño se produjo en igual proporción en los estratos inferior y medio, y muy bajo en el superior. En Habana 2000 esta afectación se apreció en mayor cuantía en el estrato medio –valor que correspondió al máximo de afectación de todas las variedades– seguido del inferior, y también menos afectadas las hojas de la porción superior, al igual que en las dos anteriores (Tabla 4). En estos valores podría estar influyendo la arquitectura

de la planta de tabaco, lo que pudiera ser motivo de otra investigación posterior.

Tabla 4. Número de hojas manchadas por estrato en cada variedad evaluada

Número de hojas/estrato	Variedades		
	Criollo 98	Corojo 99	Habana 2000
Estrato inferior	3,25 b	3,75 b	3,75 a
Estrato medio	2,50 a	4,25 b	10,00 b
Estrato superior	1,50 a	1,75 a	2,25 a
ES±	0,27	0,25	0,45

Índice de esclerofilia (IE) para cada variedad y estrato

La variedad Criollo 98 mostró el mayor valor de esclerofilia, y Habana 2000 el más bajo. Este último valor está vinculado a cutículas finas y peor estructuradas, células de paredes más delgadas y bajos valores de esclerofilia. Las condiciones de sombreo creadas, tanto por el efecto de la tela como por la superposición de las hojas de los estratos superiores, da lugar a una alta humedad relativa, y por ende es menor la intensidad de la transpiración, factores estos que inducen la formación de cutículas y paredes celulares más delgadas [Fonseca y Medina, 2002]. Muestran además una baja esclerofilia debido a su mayor grado de succulencia por constituir tejido joven (Tabla 5). Estas características dan lugar a la presencia de hojas finas que permiten la permeabilidad a microelementos depositados en la superficie como Mn y Zn, los que penetran a través de la membrana hasta el interior de los cloroplastos.

Tabla 5. Comportamiento del índice de esclerofilia en cada variedad

Variedades	Índice de esclerofilia
Criollo 98	0,74 a
Corojo 99	0,63 b
Habana 2000	0,53 c
ES±	0,01

CONCLUSIONES

- La aplicación del fungicida mancozeb es la causa de la mancha verde en la hoja de tabaco al tener como ingrediente activo el Mn.
- La mayor incidencia de la aparición de la mancha verde es en los estratos inferiores. Los menos afectados fueron los superiores. El testigo no tuvo afectación.
- La variedad Habana 2000 resultó ser la más susceptible y la de más bajo índice de esclerofilia, mo-

tivado en gran medida por sus características morfológicas.

- La variedad Criollo 98 fue la más tolerante y la de más alto índice de esclerofilia, por lo que este aspecto se relaciona con incidencia de la mancha verde.

REFERENCIAS

- Espino, E.; Xiomara Rey; V. García; Nilda Peñalver; L. M. Guardiola: «Habana 92 y Habana 2000. Dos variedades cubanas de tabaco negro resistentes al moho azul (*Perenospora tabacina*)», *Revista Cubana de Agricultura* 1(1):15-24, 2000.
- Fonseca, I.; R. Medina: «Influencia de varios tipos de tela y densidades de plantación sobre algunos indicadores anatómicos en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivado bajo tela». Memorias del Congreso del INCA (Programa de Resúmenes), Ediciones INCA, 12-15 de noviembre de 2002.
- Jordan, D. B.; W. L. Ogren: «A Sensitive Assay Procedure for Simultaneous Determination of Ribulose-1,5 Bisphosphate Carboxylase and Oxygenase Activities», *Plant Physiol.* 67:237-245, 1981.
- Kitao, M.; T. T. Lei; T. Kioke: «Comparison of Photosynthetic Responses to Manganese Toxicity of Deciduous Broad-Leaved Trees in Northern Japan», *Environmental Pollution* 1.97 (1-2):113-118, 1997a.
- Kitao, M.; T. T. Lei; T. Kioke: «Effects of Manganese Toxicity on Photosynthesis of White Birch (*Betula platyphylla* var. japonica) Seedlings», *Plant Physiol.* 101:249-256, 1997b.
- : «Application of Chlorophyll Fluorescence to Evaluate Mn Tolerance of Deciduous Broad-Leaved Tree Seedlings Native to Northern Japan», *Tree Physiology* 18:135-140, 1998.
- MINAGRI: «Manual técnico para la producción del tabaco negro tapado», Ed. Ministerio de la Agricultura, La Habana, 2001.
- : «Programa de defensa del cultivo del tabaco campaña 1999/2000», Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Subdivisión de Protección de Plantas, Departamento Programas de Defensa, La Habana, 1999.
- Nable, R. O.; R. L. Houtz; G. M. Cheniae: «Early Inhibition of Photosynthesis During Development of Mn Toxicity in Tobacco», *Plant Physiol.* 86:1136-1142, 1988.
- Pequeño, J.: *Prácticas de fisiología vegetal*, Editora del Consejo Nacional de Universidades, La Habana, 1964.
- Vázquez, Edith; S. Torres. *Fisiología vegetal*, Ed. Pueblo y Educación, La Habana, 1995.